云　南　植　物　研　究　2006，28（4）：399～402
Acta Botanica Yunnanica

几种兰花种子无菌萌发及胚胎发育过程的几种途径

王卜琼[1]，李枝林[1]，刘国民[2]，钱慧生[3]，余朝秀[1]
（1 云南农业大学，云南 昆明　650201；2 海南大学，海南 海口　570228；
3 云南城镇建设工程设计有限公司，云南 昆明　650224）

摘要：以虎头兰（黄色素花）×大雪兰、大雪兰×虎头兰（黄色素花）、虎头兰（黄色素花）×黄蝉兰、黄蝉兰×虎头兰（黄色素花）、冬凤兰、竹叶兰、窄唇蜘蛛兰、半柱毛兰、三褶虾脊兰和多花脆兰为材料，进行了杂交和自交种子无菌培养研究，并对胚胎发育进行了显微观察，结果表明：兰花种胚的发育途径有两条，一是种胚突破种皮后再转绿；二是种胚转绿后再突破种皮，且两条途径是同时进行的。种胚突破种皮的方式有3种：一是种子发育过程中，种皮慢慢消失，变成裸露的胚；二是种胚向种子的一端移动，最终突破种皮；三是种胚从种子的一侧突破种皮，形成裸胚。幼苗的发育途径有两条：一是小球体经圆球茎发育成小苗；二是小球体伸长成根茎后发育成小苗。

关键词：兰花；种子；无菌培养；胚胎学
中图分类号：Q 945　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253-2700(2006)04-399-04

Study on Seeds Aseptic Culture and Embryo Growth Routes of Several Orchid

WANG Bu-Qiong[1]，LI Zhi-Lin[1**]，LIU Guo-Min[2]，QIAN Hui-Sheng[3]，YU Chao-Xiu[1]
（1 *Yunnan Agriculture University*，Kunming 650201，China；2 *Hainan University*，Haikou 570228，China；
3 *Yunnan Town Construction and Engineering Design*，*Ltd*. Kunming 650224，China）

Abstract：Microexamination were carried out on the embryo growth of the seeds of the orchids of *Cymbidium hookerianum* × *C. mastersii*、*C. mastersii* × *C. hookerianum*、*C. hookerianum* × *C. iridioides*、*C. iridioides* × *C. hookerianum*、*C. dayanum*、*Arundina graminifolia*、*Arachnis labrosa*、*Eria corneri*、*Calanthe triplicate* and *Acampe multiflora*. We have found there were two routes for the embryo growths，carrying through at the same time. One of the route was the embryo become green after breaking through the seed coat，the other was the embryo turned green before breaking through the seed coat. We also discovered that embryo broke through the seed coat through three ways：(1) the embryo becomes a bare embryo because the seed coat disappears in growth；(2) the embryo breaks through the seed coat from one aspect of the seed；(3) the embryo breaks through the seed coat from profile，then it becomes a bare embryo. The globules grew into seedlings in two ways：(1) The globules grew into seedlings through their protocorms. (2) The globules grew first into rhizome，then into seedlings.

Key words：Orchid；Seed；Aseptic culture；Embryo growth

在细胞水平对杂交亲本进行遗传学分析对兰花育种的亲本选择具有重要意义。日本学者Tanaka在1971年提出根据细胞分裂静止期（间期核）的形态相似性可以预测兰花杂交亲本亲和力的理论，他的这一理论在兰花育种的实践中得到较为广泛的认可。在我国丰富的兰科植物中，被研究

基金项目：国家自然科学基金项目（3060074）；云南省自然科学基金重点项目（2002C003P）
通讯作者：Author for correspondence．　E-mail：LZL-YN@sohu.com
收稿日期：2005-10-25，2006-02-14接受发表
作者简介：王卜琼（1981-）女，硕士，主要从事植物形态学研究。

过胚胎发育的种共有 100 多个，其中兰属只有 2～3 种（吴应祥，1994）。通过对兰花自交和杂交种子的结构、胚的发育、种子萌发过程中植株的形态发生进行显微观察，从胚胎学水平了解兰花各种间的亲缘关系，为兰花种子无菌萌发提供参考，也为选择合适的杂交亲本提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为虎头兰（黄色素花）（*Cymbidium hookerianum* Rchb. f.）×大雪兰（*C. mastersii* Griff.）、大雪兰×虎头兰（黄色素花）、虎头兰（黄色素花）×黄蝉兰（*C. iridioides* D. Don）、黄蝉兰×虎头兰（黄色素花）、冬凤兰（*C. dayanum* Rchb. f）、竹叶兰（*Arundina graminifolia* (D. Don) Hochr.）、窄唇蜘蛛兰（*Arachnis labrosa* (Lindl.) Rchb. f）、半柱毛兰（*Eria corneri* Rchb. f）、三褶虾脊兰（*Calanthe triplicata* (Willem.) Ames）、多花脆兰（*Acampe multiflora*）的成熟蒴果，前 4 个杂交种蒴果由云南农业大学花卉研究所提供，后 6 种为野生兰花蒴果。

1.2 方法

1.2.1 种子无菌培养 中间繁殖体的诱导：取兰花杂交和自交的蒴果，用 75% 的酒精擦洗干净，放入装有 5% 洗洁精溶液的培养瓶中充分摇洗后用自来水冲洗干净。沥干水后，用 75% 的酒精消毒 5 min，再用 0.2% 的升汞灭菌 15 min，无菌水冲洗 4 次，取其内部种子接种到初代培养基上培养。其培养基为：1 2MS + 肌醇 100 mg L + 烟酸 0.5 mg L + 盐酸硫胺素 2.0 mg L + 盐酸吡哆素 1.0 mg L + 甘氨酸 2.0 mg L + 6-BA 1.0～3.0 mg L + NAA 0.5～2.0 mg L + 蔗糖 2.5% + 琼脂粉 0.8%；pH 5.8。培养条件为（25±2）℃，日光灯照明，光照强度约为 1 500 lx，每天 11 h 光照。

中间繁殖体继代培养：将种子萌发后形成的原球茎转移到继代培养基上。其成分为：MS（1 2MS；1 3 MS；H 大量元素 + MS 微量元素；SJ-1）+ 肌醇 100 mg L + 烟酸 0.5 mg L + 盐酸硫胺素 2.0 mg L + 盐酸吡哆素 1.0 mg L + 甘氨酸 2.0 mg L + NAA 0.5～1.0 mg L + 蔗糖 2.5% + 琼脂粉 1.2% + AC 0.1% + 香蕉泥 10%；pH 6.0。培养条件与中间繁殖体的诱导相同。

褐化材料的处理：容易褐化的兰花种子采用 3 种方法进行处理，(1) 将褐化种子转接到含有抗氧化剂的液体培养基上振荡培养一段时间后再转移到固体培养基上培养；(2) 直接将容易褐化的兰花种子接种到含有抗氧化剂的培养基上培养；(3) 将容易褐化的兰花种子直接接种到含有抗氧化剂的液体培养基上用摇床培养，该培养基为：1 2MS + 肌醇 100 mg L + 烟酸 0.5 mg L + 盐酸硫胺素 2.0 mg L + 盐酸吡哆素 1.0 mg L + 甘氨酸 2.0 mg L + 6-BA 1.0～3.0 mg L + NAA 0.5～1.0 mg L + 蔗糖 2.5% + PVP 0.02% + Vc 20 mg L；pH 5.8，在 60 r min 的摇床上培养 20 d 后转接到固体培养基上培养，培养基为：1 2MS + 肌醇 100 mg L + 烟酸 0.5 mg L + 盐酸硫胺素 2.0 mg L + 盐酸吡哆素 1.0 mg L + 甘氨酸 2.0 mg L + 6-BA 1.0～5.0 mg L + NAA 0.5～1.0 mg L + 蔗糖 2.5% + PVP 0.02% + Vc 20 mg L；pH 5.8。上述培养基中加入的抗氧化剂属于热分解化合物溶液，不耐高温灭菌，故采用过滤灭菌法进行灭菌，在无菌环境下，溶液先用 0.65 μm 的滤膜进行初滤，然后再用已消毒的 0.45 μm 的滤膜过滤器过滤，将滤液加到高压灭菌后的培养基中。

1.2.2 离体培养过程中，未接种的种子取样一次，以后每隔 7 d 取一次样，进行种胚及幼苗的发育动态观察。所取样用醋酸洋红染色制片，在 Motic B_5 数码生物显微镜上进行观察，并用电脑拍照保存图片资料。当胚突破并脱离种皮形成原球茎后，改用 Motic 数码体视显微镜观察，并拍照保存。

2 结果与分析

2.1 种胚的发育过程

供试兰花种子的颜色为乳白色，其形态和大小各异，种子具有透明、无色的种皮。种皮内含有大量的空气（吴应祥，1994），不易吸收水分，易于随风和水流传播。种子呈纺锤形，种子无胚乳，只有胚。包裹胚的种皮只有一层细胞构成。种皮细胞的周壁很厚，相互连接，连接处略凸起，有时会产生貌似刺状的外观。种皮细胞的细胞壁有纵横交错的条纹。种皮有薄有厚。兰花种子的胚具有分化不完全的特点，有的只是一团未分化的胚细胞。兰花种子几乎没有贮藏营养物质，而且种子也未发现有贮藏营养物质的组织。所以在自然条件下很难萌发，并且幼苗生长缓慢。

在虎头兰（黄色素花）×大雪兰、大雪兰×虎头兰（黄色素花）和虎头兰（黄色素花）×黄蝉兰的杂交种子萌发过程观察到非常严重的褐化现象，在进行褐化材料处理过程中发现，在培养基中加入 PVP 和 Vc 对褐化种子效果不明显，但液体振荡培养对解决褐化问题效果显著。其次，褐化程度很严重的材料，在没有进行任何处理的条件下，也有部分能够萌发。具体原因有待于进一步研究。

种子接种到初代培养基上后，开始吸水膨胀，种胚和种皮都不断胀大。在这一过程中，胚的发

育途径也不完全一致，主要有两种方式：一种是在胚还未转绿时就突破种皮（图 1：a），虎头兰(黄色素花) ×大雪兰和窄唇蜘蛛兰种胚主要以该途径发育。但窄唇蜘蛛兰突破种皮的胚发育到一定阶段就停止生长，未发育成转绿的小球体；另一种是胚转绿后再突破种皮，形成原球茎（图 1：b），大雪兰×虎头兰（黄色素花)、虎头兰（黄色素花) ×黄蝉兰、黄蝉兰×虎头兰（黄色素花)、冬凤兰、竹叶兰和多花脆兰则主要遵循该发育途径。在种子的发育过程中，胚的发育以其中一种为主导，其中少数种胚以另一发育途径同时进行。所有的供试材料中，半柱毛兰和三褶虾脊兰的种胚没有转绿，也没有突破种皮，生长发育到一定阶段后就停止生长，出现这种现象的原因可能是提供的培养基不适合，也可能是培养的时间不够。不同种的种子其形态学结构及发育方式差异很大，不同属间的差异更大，可作为分类学上的依据之一。如窄唇蜘蛛兰的胚所占种子的体积比较大，约3 4，而其他几个种的体积比就小很多；窄唇蜘蛛兰和半柱毛兰的胚是长柱形的，而其他几个种的胚是圆球形或椭圆形的；其次种子的形状及大小的区别也很显著。4 个杂交种的种子最大，种子的种宽与种长比明显大于其他几个自交种，其中以虎头兰（黄素）为母本的杂交种子的种宽与种长比小于以虎头兰（黄素）为父本的杂交种子。冬凤兰种子的形状是典型的纺锤形，其种胚非常小，大约是种子的 1 6，竹叶兰的种子也是纺锤形，但种子及胚都明显比冬凤兰大，其次冬凤兰的胚是原球形，竹叶兰的胚是椭圆形，两者在种子形态上很容易区别，三褶虾脊兰种子非常长，在 10 倍物镜的视野中常常看不到一个完整的种子，并且种子质地脆弱，很容易折断。

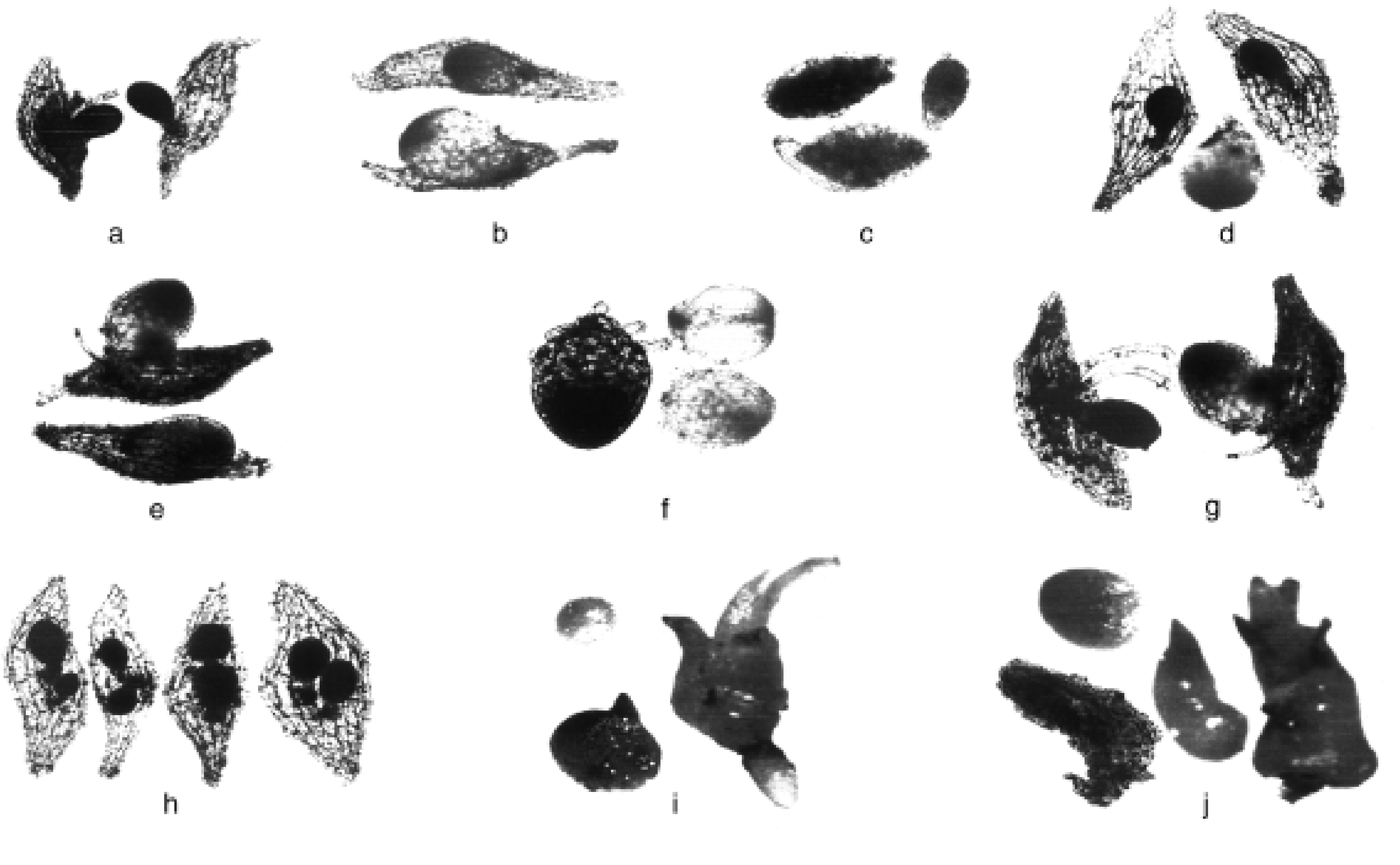


图 1　a．种胚未转绿就突破种皮；b．种胚转绿后再突破种皮；c．粘连有种皮的裸胚；d．种胚从种子的一端突破种皮；e．种胚从种子的一侧突破种皮；f．裸胚及指状突起物；g．丝状体；h．双胚种子；i．原球茎途径；j．根状茎途径

Fig．1　a．seeds that embryo became green after breaking through the seed coat；b．seeds that embryo turned green before breaking through the seed coat；c．naked embryo with little seed coat；d．seeds that embryo breaks through the seed coat from one aspect；e．seeds that embryo breaks through the seed coat from profile；f．naked embryo and digitate vesicula aerifera；g．protonema；h．two embryos seed；i．growth way from protocorm；j．growth way from rhizome

培养过程中，种胚突破种皮的方式也有差异。窄唇蜘蛛兰的种皮逐渐消失，变成裸露的胚，胚转绿时，还能观察到少数胚粘连有种皮(图 1：c)；黄蝉兰×虎头兰杂交种的胚在培养过程中，向种子的某一端移动，然后从种子的一端突破种皮形成裸胚（图 1：d)；虎头兰×黄蝉兰、虎头兰×大雪兰、大雪兰×虎头兰、竹叶兰、半柱毛兰的胚则是从种子的一侧突破种皮的

(图 1: e),种胚形成小球体时,还能观察到多数粘连有种皮。在这几种种子发育形成的原球茎上都能观察到指状突起物(图 1: f),这可能与种子萌发过程中,根毛的形成有关。4 组杂交种种子接种 2 周后观察到从胚柄处长出丝状体(图 1: g),从种子的顶端伸出,随着种胚的发育转绿,丝状体消失。

在虎头兰与黄蝉兰互为父母本的杂交蒴果中观察到双胚种子(图 1: h),但比例很小。黄蝉兰×虎头兰杂交蒴果中的双胚种子是虎头兰×黄蝉兰杂交蒴果中的双胚种子的 2～3 倍。两个胚在种子中的位置没有规律性,多数双胚种子中两个胚的大小相差不大。出现这种双胚现象,是由于合子胚在发育过程中,又分裂成两部分,每一部分又独立发育成胚。

2.2 幼苗的发育过程

种胚转绿后,3 周左右可长到油菜籽大小成为小球体,然后发育成小苗,这与罗士伟(1988)和 Rao(1977)报道的结果基本一致。不同种的小球体形成所需时间差异也很大,培养 2 周可以肉眼观察到竹叶兰转绿的小球体,窄唇蜘蛛兰在显微镜下能观察到 90%的裸胚,半柱毛兰、三褶虾脊兰和冬凤兰没有明显变化,其余 6 个种也能观察到突破种皮的胚。培养 3 周后可以观察到冬凤兰的胚开始转绿,但没突破种皮。培养 40～45 d 后肉眼可以观察到 4 个杂交种及多花脆兰已形成小球体。小球体以两条途径发育成小苗:一是原球茎途径,即在小球体顶端长出第一片叶,同时小球体增大成圆球茎,随后第二、三片叶长出,圆球茎伸长,基部长出根来,形成完整的植株(图 1: i)。虎头兰(黄色素花)×大雪兰、大雪兰×虎头兰(黄色素花)、虎头兰(黄色素花)×黄蝉兰、黄蝉兰×虎头兰(黄色素花)、冬凤兰以及多花脆兰的种胚形成的小球体是以该途径发育成小苗的;二是根状茎途径,该途径的小球体先形成根茎,在根茎顶端分化出芽,形成叶,根茎的下部分化出根形成完整的植株(图 1: j)。竹叶兰的种胚则是以根状茎途径形成小苗。

3 讨论

兰花杂交亲和性主要取决于杂交亲本的亲缘关系,亲缘关系较远的杂交不易成功。目前,我们可以从形态学及分子水平上对兰花进行分类,以确定不同种间的亲缘关系。以形态特征作为分类依据时,我们发现,同属、同种的某些特征性状在不同地区或在同一地区因生态环境不同变化很大,这给我们选择杂交亲本带来了很大麻烦。在分子水平上,物种的遗传物质是相对稳定的,受环境因素的影响较小,可靠性较高,但目前兰科植物中做过分子鉴定的种、属很少。前人对兰花胚胎学的研究也不是很多,目前大约有一百多种兰花做过胚胎学研究,不同物种的显微结构差异显著(从所做实验可以看出)。胚胎学研究受外界环境的影响较小,且费用不高,作为分类的依据之一,是比较经济和科学的。在兰花杂交育种过程中,选择杂交亲本时,应从多个角度来考证亲本间的亲缘关系,以确保杂交组合的成功。

兰花种子在无菌培养萌发过程中的形态发生也存在差异。附生兰的种子萌发初始,形成白色的圆球形的原球茎。随着原球茎体积的增大,其上出现毛状假根,继而原球茎体转为绿色,但原球茎不伸长,在原球茎顶端出现芽,长大分化出茎和叶。地生兰的种子萌发时,种子中的胚突破种皮后,开始呈白色圆球形,但很快就伸长,形成长柱形,成为地下茎或根状茎。在根状茎表面有间隔地长出一丛丛毛状假根,根状茎的顶芽分化出芽。小球体以两种途径发育成幼苗,这和杨宁生(1994)报道的结果基本一致。兰花胚及幼苗发育的深层研究,可以为兰花的组织培养中选择合适的培养基提供参考。但对兰花胚胎学及种子发育的微观研究,目前所做的工作很少。尤其是杂交种子以及亲本自交种子的系统研究,它将为杂交育种以及种子无菌培养提供细胞水平的参考。

〔参 考 文 献〕

吴应祥,1994 . 第 2 版 . 中国兰花 [M] . 北京: 中国林业出版社

罗士伟等,1988 . 经济植株组织培养 [M] . 北京: 科学出版社,170—175

Rao AN, 1977 . Tissue culture in the Orchid industry [A] . In: J . Reinert, Y . P . S . Bajaj, Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture [M] . Berlin-Heidelberg, New York: Springer-Verlang, 52—58

Yang NS(杨宁生), Yang BY(杨柏云), Zhong QP(钟青萍), 1994 . Study on seed aseptic culture of *Cymbidium faberi* Rolfe [J] . *Jiangxi Science*(江西科学), 12 (2): 80—84